

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

## ⑫ 公開特許公報(A) 昭63-104912

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 31/12

識別記号

AED  
AAB  
ABL  
ACV

庁内整理番号

7330-4C

⑬ 公開 昭和63年(1988)5月10日

C 12 N 31/70  
 // A 61 K 9/99  
 C 07 C 35/78  
 C 07 H 49/83  
 C 07 H 15/203

7252-4C

8717-4B

8413-4C

7138-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑭ 発明の名称 アルドースリグクターゼ阻害剤

⑮ 特 願 昭61-248389

⑯ 出 願 昭61(1986)10月21日

⑰ 発 明 者 女 屋 敏 正 山梨県中巨摩郡玉穂町成島1559-1 医大成島宿舎A-404

⑱ 発 明 者 多 和 田 真 人 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東472 医大上久保宿舎C-403

⑲ 発 明 者 佐 々 木 博 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 津村研究所

⑳ 発 明 者 西 村 浩 昭 茨城県稲敷郡阿見町吉原3586 津村研究所

㉑ 出 願 人 株式会社津村順天堂 東京都中央区日本橋3丁目4番10号

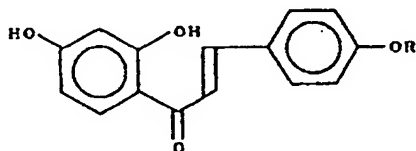
## 明 細 書

## 1. 発明の名称

アルドースリグクターゼ阻害剤

## 2. 特許請求の範囲

一般式



〔式中Rは、水素原子、グルコースまたはアピ  
 オグルコース基を示す。〕

で表される化合物を有効成分とするアルドースリ  
 グクターゼ阻害剤。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明はアルドースリグクターゼ阻害作用を有  
 し、白内障、網膜症、神経障害、腎臓等の糖尿病  
 における各種合併症の治療に有用なアルドースリ  
 グクターゼ阻害剤に関するものである。

〔従来の技術および問題点〕

近年、白内障、網膜症、腎症等の糖尿病におけ  
 る各種合併症の成因として、グルコースの代謝経  
 路であるポリオール経路を介した細胞内ソルビト  
 ールの蓄積が注目されている。ポリオール経路は、  
 グルコース、ガラクトース等のアルドースがソル  
 ビトール、ガラクトール等のポリオールを介し  
 てフルクトース等のケトースに変換される代謝経  
 路であり、免疫組織化学的手法により全身諸臓器  
 に広く存在することが明らかになってきた。

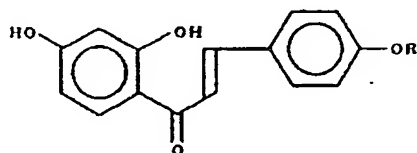
この経路の第1段階であるアルドース・ポリオ  
 ール間の変換を触媒する酵素をアルドースリグク  
 ターゼといい、この酵素がポリオール経路の律速  
 酵素と考えられている。このアルドースリグクタ  
 ーゼを阻害し、ソルビトールの産生や蓄積を低下  
 させることが、糖尿病患者における合併症の治癒  
 に有効であるという報告がなされている。

そこで、アルドースリグクターゼ阻害作用を有  
 する薬剤の開発が望まれていた。

## 特開昭63-104912 (2)

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者等は、種々の生薬についてアルドースリグクターゼ阻害作用に関する研究を行った結果、甘草(*Glycyrrhiza uralensis* FISHER, *Glycyrrhiza glabra* LINNE var. *glandulifera* REGER et HERDERまたはその他同属植物の根およびストロン)に強いアルドースリグクターゼ阻害作用があることを見出し、次いで、甘草の活性成分について研究を進めた結果、一般式で表される化合物が極めて強いアルドースリグクターゼ阻害作用を有することを見出し本発明を完成させた。すなわち本発明は、一般式



〔式中Rは、水素原子、グルコースまたはアピオグルコース基を示す。〕

で表される化合物(以下、一般式の化合物と称す

グラフィーに付し、それぞれの画分を得る。次いで、水-メタノール(1:1)溶出部、メタノール溶出部をそれぞれ水、メタノール、エタノール、エーテル、アセトン、クロロホルム、ベンゼン、水-酢酸-メタノール混合液から選ばれる少なくともひとつを溶出溶媒として、セフアデツクスLB-20等のセフアデツクス、MCIゲルCHP20P等のポーラスポリマー、セルロース、シリカゲルまたは逆相系シリカゲル等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーに数回付し、薄層クロマトグラフィーで目的成分を確認しながら分画することにより得ることができる。場合により、メタノール、エタノール、水等の適当な溶媒を用いて再結晶することにより精製してもよい。

イソリクイリチゲニン(は、レスアセトフェノンとp-ヒドロキシベンズアルデヒドとを縮合させて得ることもでき、また、相当する配糖体を硫酸などの酸で加水分解することによっても得ることができる。

る。)を有効成分とするアルドースリグクターゼ阻害剤である。

一般式の化合物には、以下に示す化合物がある。

化合物名	R
イソリクイリチゲニン (isoliquiritigenin)	水素
イソリクイリチン (isoliquiritilin)	グルコース
リクラサイド (licuraside)	グルコアピオース

これらの化合物を得るためには、例えば、次のような方法がある。

甘草を、水、アルコール類または、水とアルコール類の混合溶媒で抽出し、抽出液から除去した残渣を、順次、水、水-メタノール(1:1)、メタノールを溶出溶媒として、セフアデツクスLB-20等のセフアデツクス、ダイヤイオンHP-20等のポーラスポリマー等を担体に用いたカラムクロマト

一般式の化合物の製造の具体例を示すと次の如くである。

## 具体例1

甘草1.4kgを10ℓの水で抽出し、抽出液より水を除去して、水エキスを400gを得た。この水エキスを再び、水1ℓに溶解した後、セフアデツクスLB-20(ファルマシア製)のカラムクロマトグラフィーに付し、順次、水、水-メタノール(1:1)、メタノールで溶出した。このメタノール溶出部を再度セフアデツクスLB-20のカラムクロマトグラフィーに付し、水-メタノール混合溶媒系で濃度勾配をかけて溶出し、フラクション5[水-メタノール(4:6)溶出部]及びフラクション6[水-メタノール(3:7)溶出部]を得た。このフラクション5をMCIゲルCHP20P(三菱化成製)のカラムクロマトグラフィーに付し、水-メタノール混合溶媒で溶出し、60%メタノールで溶出する画分を減圧下で濃縮し、水-メタノールから結晶化して、Rf値0.50[薄層プレート:キーゼルゲル60F, . . .、展開溶媒:クロロホルム-メタノール

## 特開昭63-104912(3)

ル(3:1)、発色試薬:10%硫酸(橙色))の黄色針状結晶を得た。この化合物の理化学的性質は文献[R.Puri, R. Seshadri, J. Sic. Ind. Res., 13, 475 (1954)]記載のイソリクイリチンの性質と一致した。

## 具体例2

具体例1で得たフラクション6を具体例1と同様にMC1ゲルCHP20Pカラムクロマトグラフィーに付し、水-メタノール(4:6)溶出部を得た。これを更に、セルロース(アビセル、旭化成製)カラムクロマトグラフィーに付し、2%酢酸-メタノール(95:5)で溶出し、最初の2ℓで溶出する画分を減圧下で濃縮し、水-メタノールから再結晶することにより、Rf値0.25[薄層プレート:キーゼルゲル60F<sub>254</sub>、展開溶媒:クロロホルム-メタノール(3:1)、発色試薬:10%硫酸(橙色)]の黄色針状結晶を得た。この化合物の理化学的性質は文献[V. I. Litvinenko, Paratsevt. Zh. (Kiev), 18, 20 (1963)]記載のリクラシドの性質と一致した。

## 致死性

ーテル麻酔下に~~致死性~~、直ちに水晶体を摘出し、-20℃にて保存した。

水晶体は0.5mMフェニルメチルスルホニルフロリドを含む135mMナトリウム-カリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)にてホモジナイズして、30,000rpmで30分間遠心した。その上清をアルドースリグクターゼ活性測定のためとした。また、以上の操作はすべて4℃で行い、検体は0℃で保存した。

アルドースリグクターゼ活性の測定はデュフラン(Dufrane)らの方法[Biochemical Medicine, 3, 99-105 (1984)参照]により行った。すなわち、100mM硫酸リチウム、0.03mM NADPH(還元型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)、および基質として0.1mM DL-グリセルアルデヒドまたは20mM グルコースを含むように調整した135mMナトリウム-カリウム-リン酸緩衝液(pH7.0)800μlに、上記の検体100μlおよび上記具体例1~3で得た化合物をそれぞれエタノールに1×

## 具体例3

レスアセトフェノン1.5g及びp-ヒドロキシベンズアルデヒド(1.2g)をエタノール4ℓに溶解し、これに50%(v/v)水酸化カリウム溶液30ℓを加え、水浴上で2時間加熱した。反応液を氷水中に注ぎ、濃塩酸でpH1~2とし、生じた黄色結晶を濾取し、水洗後乾燥した。これを水-エタノールから再結晶して融点192~3℃、Rf値0.26[薄層プレート:キーゼルゲル60F<sub>254</sub>、展開溶媒:n-ヘキサン-酢酸エチル(3:2)、発色試薬:10%硫酸(橙色)]の黄色針状結晶を得た。この化合物の理化学的性質は文献[R.Puri, R. Seshadri, J. Sic. Ind. Res., 13, 475 (1954)]記載のイソリクイリチゲニンの性質と一致した。

次に、一般式の化合物がアルドースリグクターゼ阻害作用を有することを実験例を挙げて説明する。

## 実験例1

## &lt;アルドースリグクターゼ活性の測定&gt;

6週齢のウイスター(Wistar)系雄性ラットをエ

10<sup>-3</sup>mg/μlの終濃度となるように溶解させた薬物溶解液100μlをそれぞれ加え、30℃にて30分間反応させた。次に、0.5N塩酸0.3μlを加えて反応を停止させ、10mMイミダゾールを含む6N水酸化ナトリウム1μlを添加することにより、前記の反応によって生じたNADP(酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)を蛍光物質に変換して、60分後にその蛍光強度を測定した。蛍光強度は、室温で分光光度計RF-510(株式会社島津製作所製)を用いて励起波長360nm、蛍光波長460nmの条件で測定した。また、具体例1~3で得た化合物の溶解液を加えるかわりにエタノールを加える以外は上記と同様にして反応させて測定した蛍光強度をコントロール値とした。

アルドースリグクターゼはNADPHを補酵素として、DL-グリセルアルデヒドあるいはグルコースをポリオールに変換する酵素であり、この反応に伴ってNADPHはNADPに変化する。従ってNADPが少なければ、アルドースリグクターゼが阻害されて

## 特開昭63-104912 (4)

いることになる。

その結果を、阻害度(%)および50%阻害濃度( $IC_{50}$ )として、第1表に示す。

第 1 表  
ラットレンズのアルドースリダクターゼ  
に対する阻害作用

被験薬剤	阻害度(%) $10^{-3} \text{ mg/ml}$	$IC_{50}(M)$
コントロール	0	
具体例1で得た化合物	88.0	$7.2 \times 10^{-5}$
具体例2で得た化合物	88.0	$5.6 \times 10^{-5}$
具体例3で得た化合物	88.9	$3.2 \times 10^{-5}$

## 実験例2

## ＜赤血球中ソルビトールの定量＞

健康人前腕部静脈から採取し、ヘパリン処理した血液より得た赤血球を冷生理食塩水で3回洗浄し、更にヘマトクリット値が30%前後となるよ

の反応によって生じたNADH(還元型 nicotinamide adenine dinucleotide)を蛍光物質とし、その蛍光強度を測定し、ソルビトール量の指標とした。この反応は細胞内のソルビトールとNADをソルビトールデヒドロゲナーゼによって、D-フルクトースとNADHに変換する反応であるから、反応後のNADHが多ければ、ソルビトールの含有量が多いということになる。

なお、具体例1で得た化合物を反応時に添加せず、反応終了後に添加する以外は、上記と同様にして反応させて測定した蛍光強度をコントロール値として、 $IC_{50}$ 値(M)を求めた。

その結果、 $IC_{50}$ は $2.9 \times 10^{-5} M$ であった。

以上の結果から、本発明のアルドースリダクターゼ阻害剤はアルドースリダクターゼの活性を阻害し、赤血球中のソルビトールの蓄積を減少させることが認められ、糖尿病の合併症の予防または治療に有効であることが期待される。

次に、具体例1～3で得た化合物の経口投与での急性毒性試験をddY系マウスおよびウイスター

うに浮遊した。28 mM グルコースと上記具体例1で得た化合物をそれぞれ0.05、0.025、0.01、0.005および0.001 mg/mlの濃度になるようにエタノールあるいはDMSO(ジメチルスルフォキシド)を用いて溶解し、更に酸素95%、二酸化炭素5%で平衡化したクレブスリンガー重炭酸イオン緩衝液(bicarbonate buffer)4 mlに、上記赤血球浮遊液1 mlを加えて、37℃でインキュベートした。60分後に6%冷過塩素酸を加えて反応を止め、4℃で3,000 rpm 10分間遠心して除蛋白した。その上清に2.5 M炭酸カリウムを加えて中和した後、これを検体としてMaloneらの方法によりソルビトール濃度を測定した。

すなわち、1.0 ml中に50 mMのグリシン緩衝液(pH 9.4)および0.2 mMのNAD(酸化型 nicotinamide adenine dinucleotide)と0.64 ユニットのソルビトールデヒドロゲナーゼを含むように調製した反応混合液に、前記のようにして除蛋白した検体0.5 mlを加えて反応させた。こ

(Victar)系ラットを用いて行ったところ、具体例1～3で得た化合物は1 g/kgの経口投与で死亡例はなかった。

このように、一般式の化合物は極めて毒性が低く、安全性の高いものである。

本発明における実験データおよび急性毒性試験の結果から考えて、本発明の薬剤の有効投与量は患者の年齢、体重、疾患の程度によっても異なるが、通常成人で一般式の化合物重量として1日量120～600 mgを症状に合わせて1日3回程度に分けての服用が適当と認められる。

次に用例を示して具体的に説明するが、本発明はこれにより制限されるものではない。

## 用例1

上記の具体例1で得た化合物100 gを無水ケイ酸20 gと混合し、これにトクモロコシデンブ75 gを加え、さらに混合した。この混合物に10%ハイドロキシプロピルセルロース・エタノール溶液を100 ml加え、常法通りねっ和し、押し出し、乾燥し、篩別することにより20～50

特開昭63-104912(5)

メツシュの粒子の顆粒剤を得た。

この顆粒剤は、症状に合わせて1回量80～400mg(具体例1で得た化合物の重量として40～200mgに相当)として1日3回服用する。

#### 用例2

具体例2で得た化合物40gを無水ケイ酸20gと混合し、これに微結晶セルロース10g、ステアリン酸マグネシウム、乳糖50gを加え混合し、この混合物を単発式打錠機にて打錠して径7mm、重量120mgの錠剤を製造した。

本錠剤1錠は、具体例2で得た化合物40mgを含有する。本錠剤は、1回1～5錠、1日3回服用する。

#### 用例3

具体例3で得た化合物40mgを乳糖100mgと混合し、No.0のゼラチンカプセルに充填してカプセル剤を得た。

本カプセル剤は、症状に合わせて1回1～5カプセルを1日3回服用する。

特許出願人

株式会社 津村順天堂

代 表 者

津 村

